

УДК 576.895.772+576.311.344 : 577.152

© 1995

ЛИЗОСОМАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ В ХОДЕ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА
СЛЕПНЕЙ РОДА *HYBOMITRA*

Р. У. Высоцкая, В. В. Сорокина, В. С. Сидоров

Изучали активность кислых фосфатазы, РНКазы и ДНКазы у слепней рода *Hybomitra* на фазах яйца, личинки и имаго. Уровень общей активности лизосомальных ферментов подвержен значительным колебаниям в ходе онтогенеза насекомых. Максимальных значений кислые нуклеазы достигают в яйцах в момент выклева личинок, у непитающихся личинок младших возрастов и старших — перед окукливанием. Кислая фосфатаза в яйцах имеет меньшую активность, чем у личинок и взрослых слепней. Выявлена сезонная изменчивость активности ферментов. Показано участие лизосом в адаптивных перестройках метаболизма.

Большое практическое и теоретическое значение имеют исследования метаболизма насекомых. Этот интерес объясняется тем, что обмен веществ на протяжении жизненного цикла насекомого претерпевает существенные изменения при смене фаз развития. Скорость и направленность метаболических процессов, как известно, определяются ферментативными реакциями. Изучение набора ферментов, их строения и свойств у отдельных представителей насекомых находится на начальном этапе. Как отмечают в своем обзоре Ю. Б. Филиппович и Н. И. Минина (1976), для ферментологии насекомых характерна «крайняя фрагментарность в онтогенетическом и видовом аспектах». В большинстве случаев исследованиям подвергались виды легко доступные, являющиеся традиционно удобными объектами для биологов, такие как дрозофила, или полезные насекомые, такие как пчела, шелкопряды, муравьи, а также паразиты человека и животных (Филиппович, Коничев, 1987; Коничев и др., 1978; Miquel e. a., 1974; Skrzecz, 1990—1991). Объект наших исследований относится к свободным кровососам.

В Карелии в течение длительного времени проводились морфолого-систематические и биолого-экологические исследования слепней (Лутта, 1970; Лутта, Быкова, 1982). В то же время публикаций по биохимии слепней очень мало (Мунтян, Язловицкий, 1993; Гурьянова и др., 1993). Всестороннее изучение этой группы насекомых необходимо для биологического обоснования мероприятий и средств борьбы с ними. Особенно перспективными являются исследования ферментативной активности белков у насекомых на всех фазах развития, так как они позволяют определить наиболее чувствительные стадии в онтогенезе, когда можно успешно воздействовать на ферментные системы вредоносных насекомых и сводить к минимуму их численность.

В процессе онтогенетического развития организма важные функции выполняет лизосомальная ферментная система. Ферменты лизосом участвуют в процессах гаметогенеза, обновления тканей, расщепления отживших элементов клетки. Основной функцией этих органелл является внутриклеточное пищеварение. Все это говорит об особо важной роли лизосом у организмов со сложным жизненным циклом, претерпевающих в онтогенезе метаморфоз (Hourdry, 1974; Inokuchi e. a., 1991). Наличие комплекса кислых

гидролитических ферментов показано и у насекомых (Харсун, 1976; Коницев и др., 1978, 1979; Sommer, Spindler, 1991).

В задачу настоящего исследования входило изучение активности ферментов лизосом у слепней рода *Hybomitra* в ходе их жизненного цикла.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследовали слепней рода *Hybomitra* на фазах яйца, личинок I—IX стадий и имаго. Сбор материала осуществляли вручную в местах выплода насекомых: на болотах, лугах, мелких водоемах, по берегам рек и ручьев по методике Лутта (1970). Личинок и кладки яиц помещали в пенициллиновые флаконы с субстратом (мох, торф, почва, листья и побеги высших растений). Весной личинок собирали сразу после снеготаяния в период выхода их из состояния покоя, летом — в период активного питания, осенью — перед зимовкой из-под ледяного покрова. Часть личинок осенних сборов содержали в холодильной камере в течение нескольких месяцев. На анализ их брали зимой. Кладки яиц собраны в конце июля—начале августа, взяты на биохимический анализ в момент начала вылупления личинок. Имаго — только вылетевшие из собранных в природе и содержавшихся в лаборатории куколок.

Из исследуемого материала готовили 10%-е гомогенаты в 0.25 М растворе сахарозы, содержащем 0.001 М ЭДТА, pH 7.4. Гомогенизацию осуществляли в мягких условиях в гомогенизаторе типа Поттера на холоде. Гомогенат осветляли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин. В надосадочной жидкости определяли неседиментируемую активность ферментов. Для определения общей активности ферментов в пробы при гомогенизации добавляли неионный детергент тритон X-100 в конечной концентрации 0.1%. Детергент разрушает мембраны лизосом, солюбилизирует заключенные в органеллах ферменты, но в применяемой концентрации не оказывает ингибирующего влияния на активность ферментов. Определяли активность кислых фосфатазы, ДНКазы и РНКазы. Уровень фосфатазы выявляли по методу Бессея с соавторами, используя в качестве субстрата п-нитрофенилфосфат натрия (Биохимические методы исследования в клинике, 1969). Для определения активности нуклеаз использовали спектрофотометрические методы: ДНКазы — Покровского с соавторами (Покровский, Арчаков, 1968), РНКазы — Левицкого с соавторами (1973).

По каждому варианту было исследовано 4—5 проб. Навеска материала (1 г) состояла в зависимости от стадии развития из 3—50 экз. личинок или взрослых насекомых. Таким образом, уже сама проба, взятая на биохимический анализ, представляла собой в значительной степени усредненный материал, в котором нивелировались возможные различия между отдельными особями. При статистической обработке данных использовали непараметрический критерий U Вилкоксона—Манна—Уитни, рекомендуемый при малых выборках (Гублер, Генкин, 1969).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что активность лизосомальных ферментов на протяжении жизненного цикла слепней подвержена значительным изменениям (рис. 1—3). Уровень кислых гидролаз в яйцах насекомых перед вылуплением личинок довольно высок, в первую очередь это относится к нуклеазам.

Максимальные значения кислой фосфатазы отмечены у личинок IV—V стадий развития, живших в лабораторных условиях и взятых на анализ в феврале. Затем на VI—VIII стадиях она несколько снижается и вновь резко возрастает у личинок старших возрастов (VIII—IX). Профиль кислых нуклеаз

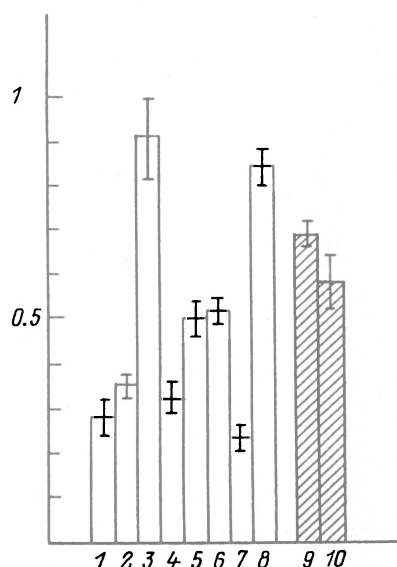


Рис. 1. Активность кислой фосфатазы на разных фазах жизненного цикла слепней рода *Hybomitra* (в микромолях п-нитрофенола/мин/г сырого веса).

Здесь и на рис. 2, 3: 1 — яйца; 2 — личинки I стадии, 3 — личинки IV—V стадий, 4 — личинки VI—VII стадий, 5 — личинки VI—VIII стадий, 6 — личинки VII—IX стадий, 7 — личинки VII—VIII стадий, 8 — личинки VIII—IX стадий (преджуколка); 9 — имаго (июнь), 10 — имаго (июль).

Fig. 1. Activity of acid phosphatase in different phases of the life cycle of *Hybomitra* horse flies (in micromol of p-nitrophenol/min/g wet weight).

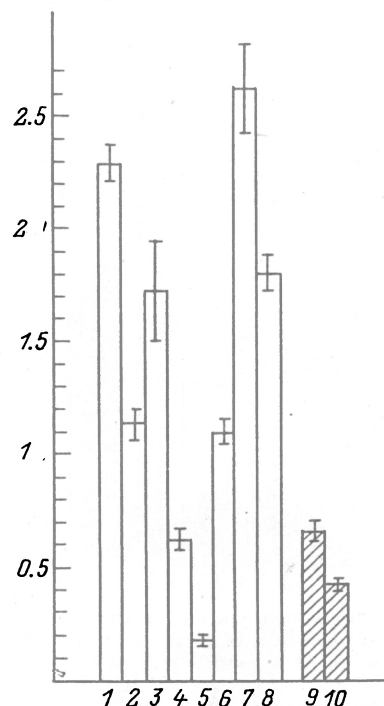


Рис. 2. Активность кислой ДНКазы на разных фазах жизненного цикла слепней рода *Hybomitra* (в ΔE_{260} /мин/г сырого веса).

Fig. 2. Activity of acid DNA-ase in different phases of the life cycle of *Hybomitra* horse flies (in ΔE_{260} /min/g wet weight).

в общих чертах схож с описанным для фосфатазы. Обращает на себя внимание более резкий спад их уровня у личинок VI—VII стадий.

У взрослых насекомых активность изученных ферментов имеет высокие значения, но ниже, чем у личинок перед окукливанием.

Сравнение общей активности лизосомальных ферментов у личинок VII—VIII стадий, взятых на анализ в разные сезоны года, показало, что максимальной она была зимой и минимальной летом (рис. 4).

Отношение неседиментируемой активности ферментов к общей, по которому можно судить о состоянии лизосомальных мембран, также изменяется в зависимости от фазы жизненного цикла насекомого (рис. 5).

Особенности биологии слепней определяют характерные для видов умеренного пояса большие колебания в длительности метаморфоза. Личинки из одной кладки могут развиваться ускоренно, с очень короткой диапаузой, а другие — замедленно, с выраженной диапаузой на последних стадиях. По какому пути будет развиваться личинка, зависит от внешних условий, главным образом от температуры среды. Для развития каждого вида слепней необходима определенная сумма градусо-дней, которая накапливается в течение месяцев в южных климатических зонах и в течение лет на севере. В годы с холодным летом развитие личинок затягивается, их организм обладает способностью к замедлению обмена веществ вплоть до холодового оцепенения. При наступлении благоприятных условий метаболизм интенсифицируется, продолжаются рост и развитие насекомого (Лутта, 1970). Важную роль в адаптации личинок

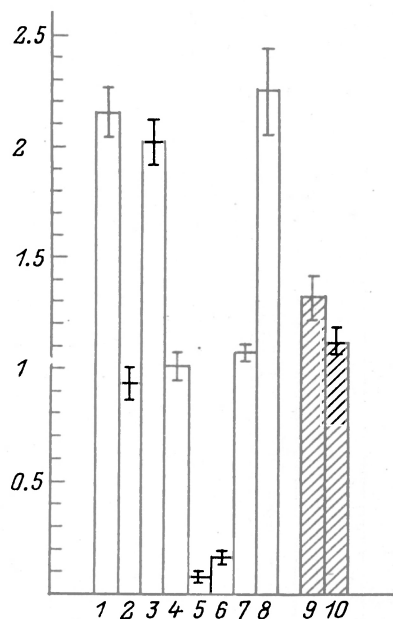


Рис. 3. Активность кислой РНКазы на разных фазах жизненного цикла слепней рода *Hybomitra* (в ΔE_{260} /мин/г сырого веса).

Fig. 3. Activity of acid RNA-ase in different phases of the life cycle of *Hybomitra* horse flies (in ΔE_{260} /min/g wet weight).

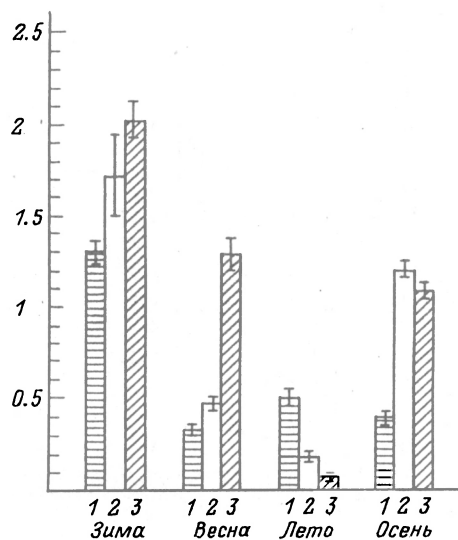


Рис. 4. Изменение общей активности лизосомальных ферментов у личинок слепней рода *Hybomitra* VII–VIII стадий зрелости в разные сезоны года.

1 — кислая фосфатаза; 2 — ДНКазы; 3 — РНКазы.

Fig. 4. Changing of general activity of lysosomal enzymes in *Hybomitra* horse fly larvae of VII–VIII ages in different seasons of the year.

слепней к меняющимся температурным условиям выполняет лизосомальный аппарат клеток. С понижением температуры происходит переключение обмена веществ на внутренние ресурсы. Реакции синтеза замедляются, обеспечение энергией и поддержание необходимого уровня метаболизма осуществляются за счет утилизации, включая гидролиз, запасенных ранее веществ. Как показали наши исследования, наиболее высокий уровень лизосомальных ферментов наблюдался у личинок слепней в более холодное время года, когда личинки вынуждены переходить на эндогенное питание (рис. 4). Наличие развитого лизосомального аппарата позволяет им переносить длительное голодание. Летом, когда личинки активно питаются, активность лизосомальных гидролаз значительно ниже, в это время работают другие пищеварительные ферменты.

С другой стороны, наблюдался высокий уровень изученных ферментов и в летние месяцы. Это связано с участием лизосом в процессах аутофагии, ликвидации отживших элементов клетки и ненужных структур при переходе насекомого с одной фазы развития на другую или в моменты линек на фазе личинки (рис. 1–3). У личинок младших возрастов высокий уровень лизосомальных ферментов объясняется, кроме того, тем, что они не питаются. Переход на экзогенное питание происходит на III стадии развития, с каждой стадией усиливаются их агрессивность (*Hybomitra* — хищники) и полифагия. С этим связано снижение активности кислых гидролаз у личинок VI–VII стадий, взятых на анализ в летние месяцы. Когда личинки старших возрастов готовятся к окукливанию, они перестают питаться, и в этот момент наблюдалось возрастание активности лизосомальных ферментов, а следовательно, и роли лизосом в обеспечении необходимого уровня обмена веществ. Полученные

нами результаты показывают важное значение лизосомального аппарата в процессах метаморфоза у слепней. То же самое было продемонстрировано ранее для комаров. Авторы (Mills, Lang, 1972) показали, что кислая фосфатаза (фермент-маркер лизосом) у личинок комаров имеет довольно низкое значение. По мере развития она увеличивается и достигает максимума у молодых взрослых особей. Затем активность этого фермента быстро снижается и остается постоянной на протяжении всей жизни взрослых комаров. Такая зависимость характерна и для других животных, в жизненном цикле которых имеется стадия метаморфоза. Например, у головастиков активность всех лизосомальных ферментов в значительной степени возростала на стадиях личиночного развития и резко падала в конце метаморфоза (Hourdry, 1974).

На стадии яйца, в начале и конце личиночного развития у слепней рода *Hybomitra* обнаружена высокая активность кислых нуклеаз. Похожие данные получены для насекомых и другими исследователями. Видута и Севастьянова (1979), изучавшие дезоксирибонуклеазную активность в онтогенезе тутового шелкопряда, отмечают, что максимальная активность кислой ДНКазы была у только что вышедших из яйца личинок. В наших исследованиях кладки яиц слепней подвергались анализу в момент начала выклева, т. е. тогда, когда происходили активно процессы деградации, расщепления существующих эмбриональных тканей. В течение длительной многоэтапной личиночной фазы в организме слепней происходят многочисленные перестройки, когда отдельные ткани подвергаются лизису, а другие вновь синтезируются. В этих процессах участвуют ферменты нуклеинового обмена, в том числе кислые нуклеазы, осуществляющие расщепление отработавших нуклеиновых кислот. Продукты деградации используются организмом на последующих фазах развития в качестве исходных продуктов для синтеза.

Кислая фосфатаза — лизосомальная фосфомоноэстераза широкого спектра действия, играющая важную роль в обмене углеводов, липидов, нуклеиновых кислот и фосфорных соединений. Неорганическому фосфору принадлежит ключевая роль в регуляции энергетического обмена клетки в целом (Wu, Racker, 1959), поэтому изучение активности кислой фосфатазы может дать полезную информацию как о функционировании лизосомального аппарата, так и о состоянии энергетических и других обменных процессов в клетке. В яйцах слепней активность кислой фосфатазы в отличие от нуклеаз имеет более низкие значения, чем у личинок и взрослых насекомых. В литературе есть указания на существенную роль кислой фосфатазы в фосфорном обмене насекомых преимущественно на фазе имаго (Филиппович, Минина, 1976). Полученные нами данные подтверждают это положение.

Продолжительность фазы личинки у слепней в северных широтах, возможность развития их по двоякому пути отражаются на картине варьирования показателей свободной и общей активности лизосомальных ферментов на раз-

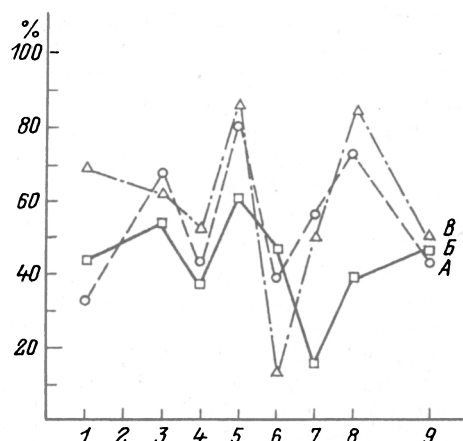


Рис. 5. Отношение свободной активности лизосомальных ферментов к общей на разных фазах жизненного цикла слепней рода *Hybomitra* (в %).

А — кислая фосфатаза; Б — ДНКаза; В — РНКаза; 1 — яйца; 2—8 — личинки I—IX стадий; 9 — имаго.

Fig. 5. Ratio of free activity of lysosomal enzymes to general one in different phases of life cycle of *Hybomitra* horse flies (in %).

ных стадиях развития. Наряду со снижением уровня лизосомальных ферментов у активно питающихся летом личинок наблюдается и довольно резкое его возрастание, которое может быть объяснено как переходом на следующую стадию развития, происходящими процессами деградации во время линьки, так и разными сроками предшествующего развития личинок.

Обсуждаемая особенность физиологии слепней накладывает отпечаток своеобразия и на синтезируемые у личинок лизосомальные структуры. По соотношению «неседиментируемой», или растворимой, и общей активности лизосомальных ферментов можно судить о функциональном состоянии лизосомального аппарата. В процессе работы первичные лизосомы, содержащие только гидролазы, сливаются с ауто- и гетерофагосомами, включающими подлежащий гидролизу материал, и образуют вторичные лизосомы. Последние крупнее по размеру и имеют лабильную мембрану, которая легко может быть разрушена. Ранее нами было показано, что летом в тканях животных, в частности рыб, синтезируется меньше лизосом и они имеют более прочную мембрану, поэтому в этот сезон года, как правило, определяется меньший процент растворимой фракции лизосомальных ферментов, а сами лизосомы, представленные первичными структурами, более устойчивы к воздействию внутренних и внешних факторов различной природы (Высоцкая, Рипатти, 1988). Высокий уровень неседиментируемой активности лизосомальных ферментов свидетельствует о наличии большого числа вторичных лизосом, что объясняется частой сменой стадий развития и активным функционированием в связи с этим лизосомального аппарата у личинок слепней. У комара процент растворимой кислой фосфатазы нарастал по мере развития личинки, резко поднимался в фазе куколки, достигая 90%, и затем снижался у имаго (Mills, Lang, 1972). По нашим данным, это в общем справедливо и для слепней, случаи снижения доли растворимой фракции ферментов объясняются особенностями онтогенеза слепней в условиях севера.

Таким образом, проведенные исследования показали, что комплекс лизосомальных ферментов выполняет важную роль в адаптивных перестройках организма слепней на всех фазах развития. Отмечена определенная возрастная специфичность в синтезе тех или иных кислых гидролаз: на ранних стадиях большое значение имеют нуклеазы, а на фазе имаго — кислая фосфатаза. Существенное влияние на функционирование лизосом оказывает сезон года. Наиболее активно работает лизосомальный аппарат, производя процессы аутолиза при переходах с одной на другую стадию развития и внутриклеточного пищеварения, когда организм переключается на эндогенное питание. Последнее может быть вызвано влиянием как внутренних, так и внешних факторов. Большие колебания в длительности метаморфоза у слепней умеренного пояса являются приспособлением, благодаря которому возможно осуществление полного жизненного цикла в экстремальных условиях среды. Значительная часть этих приспособительных реакций осуществляется с помощью лизосом.

Список литературы

- Биохимические методы исследования в клинике. Справ. М.: Медицина, 1969. 652 с.
- Видута О. Д., Севастьянова Г. А. Дезоксирибонуклеазная активность растворимых белков в онтогенезе тутового шелкопряда // Биохимия насекомых. Вып. XXI. М.: МГПИ им. В. И. Ленина, 1979. С. 109—120.
- Высоцкая Р. У., Рипатти П. О. Воздействие детергентов на структуру и функционирование лизосом у пресноводных рыб // Физиология и токсикология гидробионтов. Ярославль: Яросл. гос. ун-т, 1988. С. 100—106.
- Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 25 с.

- Гурьянова С. Д., Сорокина В. В., Сидоров В. С. Влияние мермитид *Paramermis tabanivora* на липидный статус личинок слепней рода *Hybomitra* // Паразитология. 1993. Т. 27, вып. 5. С. 391—395.
- Коницев А. С., Филиппович Ю. Б. Активность кислой фосфатазы в легкой митохондриальной и постмитохондриальной фракциях грены родительских пород и гетерозисных гибридов тутового шелкопряда // Биохимия насекомых. Вып. XXI. М.: МГПИ им. В. И. Ленина. 1979. С. 28—36.
- Коницев А. С., Филиппович Ю. Б., Макулин А. И. Активность кислой фосфатазы в субклеточных фракциях грены тутового шелкопряда // Там же. С. 16—21.
- Коницев А. С., Филиппович Ю. Б., Шамшина Т. Н. Активность кислой фосфатазы в грене родительских пород и гетерозисных гибридов тутового шелкопряда // Биохимия насекомых. Вып. XX. М.: МГПИ им. В. И. Ленина, 1978. С. 2—10.
- Левицкий А. П., Барабаш Р. Д., Коновец В. М. Сезонные особенности активности рибонуклеазы и α -амилазы слюны и слюнных желез у крыс линии Вистар // Биохимическая эволюция. Л.: Наука, 1973. С. 192—195.
- Лутта А. С. Слепни Карелии (Diptera, Tabanidae). Л.: Наука, 1970. 303 с.
- Лутта А. С., Быкова Х. И. Слепни (сем. Tabanidae) Европейского Севера СССР. Л.: Наука, 1982. 184 с.
- Мунтян Е. М., Язловецкий И. Г. Характеристика амилазы средней кишки личинок златоглазки обыкновенной *Chrysopa carnea* // Журн. эвол. биохим. физиол. 1993. Т. 29, № 3. С. 236—243.
- Покровский А. А., Арчаков А. И. Методы разделения и ферментной идентификации субклеточных фракций // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1968. С. 5—59.
- Филиппович Ю. Б., Коницев А. С. Множественные формы ферментов насекомых и проблемы сельскохозяйственной энтомологии. М.: Наука, 1987. 168 с.
- Филиппович Ю. Б., Минина Н. И. Ферменты насекомых. Биологическая химия (Итоги науки и техники). Т. 9. М.: ВИНТИ, 1976. 218 с.
- Харсун А. И. Биохимия насекомых / Под ред. акад. А. А. Спасского. Кишинев: Изд-во Картия Молдовеняскэ, 1976. 336 с.
- Hourdry J. Dosage des activites de quelques hydrolases lysosomiques testinales au cours du developpement larvaire de *Discoglossus pictus* otth, Amphibien anoure // W. Roux'Arch. Entwicklungsmech. Organism. 1974. Vol. 174, N 3. P. 222—233.
- Inokuchi T., Kobayashi K.-I., Horiuchi Sh. Acid proteinases of the fove-gut in metamorphosing tadpoles of *Rana catesbeiana* // Compar. Biochem. and Physiol. B. 1991. Vol. 99, N 3. P. 653—662.
- Mills B. J., Lang C. A. Acid phosphatase profile during the life-span of the mosquito // J. Gerontol. 1972. Vol. 27, N 3. P. 333—337.
- Miquel J., Tappel A. L., Dillard C. J., Herman M. M., Bensch K. G. Fluorescent products and Lysosomal components in aging *Drosophila melanogaster* // J. Gerontol. 1974. Vol. 29, N 6. P. 622—637.
- Skrzecz I. Zawartość lizozymu w hemolimfie wybranych gatunków Lepidoptera i Hymenoptera // Pr. Inst. Bad. Leś. 1990—1991. N 711—716. S. 93—100.
- Sommer U., Spindler R.-D. Demonstration of β -N-acetyl-D-glucosaminidase and β -N-acetyl-D-hexosaminidase in *Drosophila* K_c-cells // Arch. Insect. Biochem. and Physiol. 1991. Vol. 17, N 1. P. 3—13.
- Wu R., Racker E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism // J. Biol. Chem. 1959. Vol. 234. P. 1029—1036.

Институт биологии
Карельского научного центра РАН,
Петрозаводск, 185610

Поступила 12.06.1994

LYSOSOMAL ENZYMES IN LIFE CYCLE OF HORSE FLIES OF THE GENUS HYBOMITRA

R. U. Vysotskaya, V. V. Sorokina, V. S. Sidorov

Key words: horse flies, *Hybomitra*, enzymes of lysosomes.

SUMMARY

The activity of acid phosphatase, RNAase and DNAase in ovum, larvae and imago phases of horse flies of the genus *Hybomitra* was studied. The rate of the total activity of lysosomal enzymes is a subject of considerable fluctuation during the ontogenesis of these insects. Maximal values of activity of acid nucleases were observed in ovum at the moment of larva hatching, in non-feeding larvae of younger ages, and in elder ones before the pupation. The acid phosphatase in ovum had lesser activity than in larvae and adult horse flies. The seasonal variability of the enzymatic activity was recovered. The participation of lysosomes in adaptive reconstructions of metabolism is shown.